

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-022981

(43)Date of publication of application : 31.01.1991

(51)Int.Cl.

C12N 15/10
C07H 1/06
C07H 21/02

(21)Application number : 01-158607

(71)Applicant : AKITA PREF GOV
EIKEN CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 21.06.1989

(72)Inventor : KITAGAWA YOSHICHIKA

(54) PURIFICATION OF POLY(A)+MRNA USING MONOCLONAL ANTIBODY REACTING WITH POLY(A)

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a monoclonal antibody which can purify poly(A)+mRNA by producing an antibody reacting with poly(A) using fused cells from mouse spleen cells immunized with poly(A).poly(dT) and myeloma cells.

CONSTITUTION: BALB/C mouse is immunized with a complex of poly(A).poly(dT) and methylated albumen and the spleen cells are collected after the final immunization. Then, the cells are fused with mouse myeloma cells (p3-X63Ag8) and cultured in the HAT medium to form the hybridoma. Then, the clone producing the antibody reacting with poly(A) is selected and the monocloned cells are cultured to produce the monoclonal antibody reacting with poly(A). The antibody is mixed with the whole RNA originating from cells, the precipitate formed is treated with phenol to give the poly(A)+RNA.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

平3-22981

⑤Int.Cl.³

識別記号

庁内整理番号

④公開 平成3年(1991)1月31日

C 12 N 15/10
C 07 H 1/06
21/02

7822-4C
7822-4C
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑥発明の名称 poly(A)と反応するモノクローン抗体を用いた poly(A)⁺mRNAの精製法

①特 願 平1-158607

②出 願 平1(1989)6月21日

特許法第30条第1項適用 昭和63年12月23日開催の「第11回日本分子生物学会大会」において文書をもつて発表

⑦発 明 者 北 川 良 親 秋田県秋田市下北手松崎字大巻26-75
⑦出 願 人 秋 田 県 秋田県秋田市山王4丁目1番1号
⑦出 願 人 栄研化学株式会社 東京都文京区本郷1丁目33番8号
⑦代 理 人 弁理士 藤盛 道夫

明 細 書

1 発明の名称

poly(A)と反応するモノクローン抗体
を用いた poly(A)⁺mRNAの精製法

2 特許請求の範囲

- (1) poly(A)・poly(dT)で免疫したBALB/Oマウス脾細胞とマウスミエロマ細胞(P3-X63 Ag8)との細胞融合により得られたハイブリドーマより、poly(A)と反応する抗体を生産することを特徴とするpoly(A)と反応するモノクローン抗体の製造法。
- (2) 請求項(1)のハイブリドーマクローン抗体を含むBALB/Oマウスの腹水にpoly(A)を加え沈降反応した抗体の沈降物をジメチルスルホキシドで解離させ、DEAEセルロースカラムで分離するハイブリドーマクローン抗体の分離法。
- (3) 請求項(1)のハイブリドーマクローン抗体と

poly(A)⁺mRNAとを混合し、沈降反応によりpoly(A)⁺mRNAを沈澱として回収するpoly(A)⁺mRNAの回収法。

- (4) 請求項(1)のハイブリドーマクローン抗体と細胞由来の全RNAとの沈降物よりpoly(A)⁺mRNAをフェノール処理により生物活性をもつpoly(A)⁺mRNAを回収するpoly(A)⁺mRNAの回収法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はpoly(A)と沈降反応するモノクローン抗体の製造、抗体の精製及びその利用に関するものであり、更に本発明の方法により製造されるモノクローン抗体および利用法は細胞由来のごく少量の全RNAからpoly(A)⁺mRNAの分離に利用される。

(従来の技術)

細胞由来のRNAからpoly(A)⁺mRNAを分離するにはoligo(dT)-セルロースカラムが一般

に用いられている。また、最近では oligo(dT) - セルロースパウダーが発売され、遠心法により poly(A)⁺ mRNA を分離する方法が報告されている。上記の oligo(dT) - セルロースカラム法及び oligo(dT) - セルロースパウダー法のいずれも oligo(dT) と poly(A)⁺ mRNA の poly(A) 鎖の物理的ハイブリタイゼーションを原理としている。現在でもこれらの方法により poly(A)⁺ mRNA は調製されている。しかし、いずれも高価で、かつ、全 RNA 量として前者は数 mg、後者でも数 100 μg が最低必要であり、操作も前者は特に繁雑である等の欠点があつた。

(発明が解決しようとする課題)

上記に鑑みて本発明における抗体による poly(A)⁺ mRNA の分離法は、抗核糖抗体の強い沈降反応性を利用することにより全 RNA の量は従来の技術による方法の数分の 1 ないし数 10 分の 1 で済むようにしようとする。また、モノクローン抗体はマウス腹水によつて大量生産を可能としようとする。更に、poly(A)⁺ mRNA の

A)⁺ mRNA を沈殿として回収すること。

- (4) A 1 抗体と細胞由来の全 RNA との沈降物より poly(A)⁺ mRNA をフェノール処理により生物活性をもつ poly(A)⁺ mRNA として回収すること。

ここでは、グロビン・DNA pSVMA G 5 とのドットハイブリダイゼーションによりグロビン mRNA 量の定量を行い、また、分離した poly(A)⁺ mRNA の小麦胚芽無細胞蛋白質合成系でのグロビンの合成能を調べて前記生物活性を確認した。

(作用)

本発明は poly(A) と反応して沈殿を形成するモノクローン抗体を製造し、それを用いるため poly(A)⁺ mRNA の新しい分離手法となる。

(実施例)

- 1) poly(A)・poly(dT) とメチル化アルブミンの複合体 400 μg で BALB / O マウス (♀ 4 週令) を毎週 1 回、全部で 3 回免疫し、脾細胞約 6×10^6 個採取し、一方、培養して

分離のみならず検出法として組織化学分野への利用を可能としようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は下記の手段を採用する。

- (1) poly(A)・poly(dT) で免疫した BALB / O マウス脾細胞とマウスミエローマ細胞 (P 3 - X 6 3 Ag 8) との細胞融合により得られたハイブリドーマより、poly(A) と反応する抗体を生産すること。
- ここではハイブリドーマクローンの名称を A 1 と名づけ、抗体の名称を A 1 抗体と名づける。ハイブリドーマは BALB / O マウス腹腔に注射して A 1 抗体を含む腹水を得た。
- (2) A 1 抗体を含む腹水に poly(A) を加え沈降反応した抗体の沈降物を 5 % ジメチルスルホキシド (PH 10.5) で解離させ、DEAE セルロースカラムで分離すること。
- (3) A 1 抗体と、フェニールヒドラジン処理により貧血にしたマウスの脾細胞由来の poly(A)⁺ mRNA とを混合し、沈降反応により poly(A)

得たマウスミエローマ細胞 (P 3 - X 6 3 Ag 8) 6×10^5 と混合後、44.4 % ポリエチレングリコール 1500 を用いて細胞融合させハイブリドーマを得る。

- 2) 当該ハイブリドーマの内、poly(A) と反応する抗体を生産するハイブリドーマクローンを分離する。抗体生産の検定は poly(A) をポリリジンでコートしたマイクロタイタープレートに吸着させ、ハイブリドーマ培養液を加え、培養液中に存在する抗体を poly(A) と反応させ、その後反応した抗体をパーオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス IgG 抗体とパーオキシダーゼ基質を用いて検出する。分離したハイブリドーマ A 1 を BALB / O マウス腹腔に注射し、A 1 抗体を含む腹水を得る。
- 3) A 1 抗体を含む腹水 10 ml に poly(A) 2.5 mg を加え、生じる沈殿を 30 ml の 5 % ジメチルスルホキシド (PH 10.5) に溶解後、DEAE セルロースカラムにから 0.1 M NaCl - 5 % ジメチルスルホキシド (PH 10.5) で

素通り固分を洗い流した後、更に0.3 M Na₂CO₃ 0.1-5%ジメチルスルホキシド (PH 10.5) で特異抗体を分離回収する(図-1)。抗体液は10ml トリス塩酸緩衝液で透析後冷凍保存する。回収抗体量は19.2mgである。

4) 精製A1抗体の反応特異性を酵素抗体免疫測定法により検定した。その結果、ポリマー核酸の内poly(A)、poly(dT)、poly(I)、poly(dC)が反応するが表-1に上げたような抗原は反応しなかった。

5) 抗体によつて沈降するpoly(A)の大きさをマウス5S RNA及びタバコモザイクウイルスRNA(1.6 K塩基)にpoly(A)ポリメラーゼと³H ATPを用いて種々の長さのpoly(A)を付加した後、抗体と反応させ沈降するトリチウムを測定して決めた。

その結果表-2に示すように最低20~30塩基のpoly(A)があれば1.6 K塩基のRNAも定量的に沈降することが確かめられた。

6) A1抗体がDNA、rRNA、5S RNA

7) 6)と同様にして抗体で沈降するpoly(A)⁺ mRNAを回収し、そのRNAの小麦胚芽無細胞蛋白質合成系における蛋白質翻訳活性を調べたところ表-3の結果のごとく高い翻訳活性があつた。

すなわち、分離したpoly(A)⁺ mRNAは分子生物学の研究に十分使用しうる純度を有していると思われる。

(発明の効果)

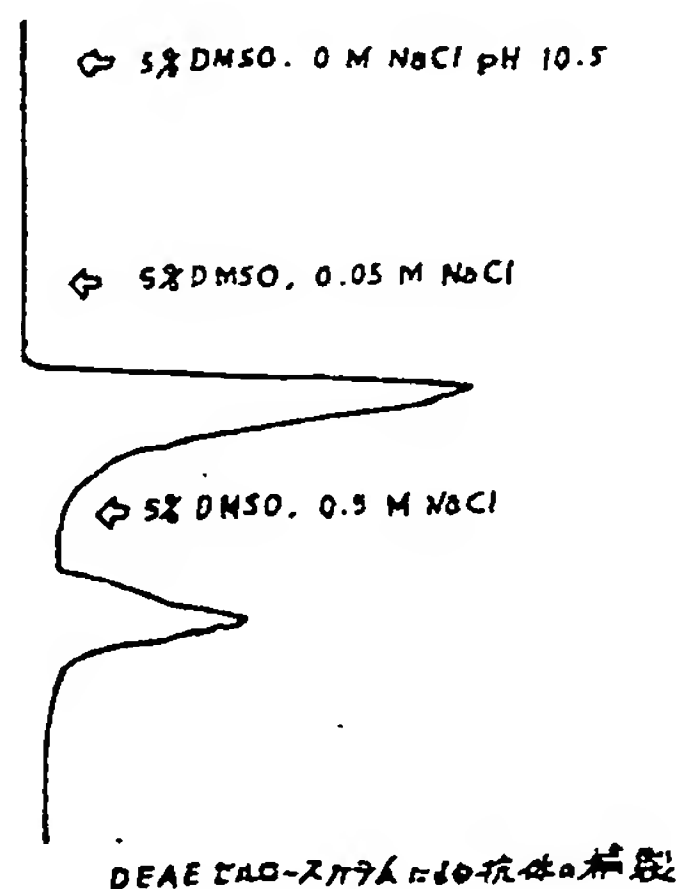
本発明によれば、全RNAの量は少量で済み、モノクローン抗体はマウス腹水として量産できる。

4 図面の簡単な説明

第1図はDEAEセルロースカラムによる抗体の精製表、第2図はドットハイブリダイゼーション表、表1はA1抗体の反応特異性を示し、表2はpoly(A)鎖を付加したRNAの反応を示し、表3は抗体で沈降したRNAのin vitro蛋白質合成量を示す。

及びtRNA等細胞に通常存在する核酸と反応しないこと及びpoly(A)⁺ mRNAと反応すること(表-1)から、細胞の全RNAからpoly(A)⁺ mRNAのみ分離することが可能である。それを確かめるためにフェニルヒドラジン投与マウス脾細胞から抽出した全RNAからpoly(A)⁺ mRNA(グロビンmRNAが最も多い)の分離を行つた。すなわち、脾細胞由来全RNA 200 μgにA1抗体100 μgを加え沈殿からフェノール法でRNAを回収し(約8 μg)、そのRNAの中のグロビンmRNA量を定量した。グロビンmRNA量はグロビンDNAを含むプラスミドpMB05をニクトランスレーションで³²Pラベルし、抗体で沈殿したRNAをナイロンメンブラン上に固定してハイブリダイズするドットプロット法で行つた。その結果図-2に示したように抗体で沈殿したRNA中にグロビンmRNAが最も多く回収され、本方法によりpoly(A)⁺ mRNAが分離できることが確かめられた。

第1図



第2図

E. coli tRNA	10ug	⊕
Total RNA	1ug	⊕ ⊕ ⊕
Abppt RNA	1ug	⊕ ⊕ ⊕
Ab sup RNA	1ug	⊕ ⊕

ドットハイブリダイゼーション

手続補正書

平成 1 年 10 月 6 日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

1. 事件の表示
平成
昭和 1 年 特 許 願 第 1 5 8, 6 0 7 号
2. 発 明 の 名 称
poly(A)と反応するモノクローン
抗体を用いた poly(A)⁺ mRNA の
精製法
3. 補正をする者 特 許 出 願 人
事件との関係
住所 (居所) 秋田県秋田市下北手松崎字大巻
26の75
氏名 (名称) 北 川 昌 夫
4. 代理人 〒010 (ほか/名)
住 所 秋田県秋田市横山本町7番48号
氏 名 6042 弁護士 藤 盛 道 夫
電 話 (0188) 32局 4 7 3 6

5. 補正命令の日付
平成1年9月26日
6. 補正の対象
願書、明細書、図面



素通り固分を洗い流した後、更に 0.3 M NaCl
0.1-5% ジメチルスルホキシド (PH 10.5
) で特異抗体を分離回収する (第1図)。抗
体液は 10ml トリス塩酸緩衝液で透析後冷凍
保存する。回収抗体量は 19.2mg である。

4) 精製 A1 抗体の反応特異性を酵素抗体免疫
測定法により検定した。その結果、ポリ
マー核酸の内 poly(A)、poly(dT)、poly(I)、
poly(dG) が反応するが下記表 1 に上げたよ
うな抗原は反応しなかった。

表 1 A1 抗体の反応特異性
反応する核酸 反応しない核酸

A+dT	A+dT (S1)
A	I+dG (S1)
dT	U
dG	G
mRNA glo	dA
	dG
	dA+dT
	dG+dG
	naDNA (Salmon)
	RDV-RNA
	A+U

I+G
rRNA (E. coli)
5SRNA (Yeast)
tRNA (Yeast)

5) 抗体によつて沈降する poly(A) の大きさを
マウス 5SRNA 及びタバコモザイクウイル
ス RNA (1.6 K 塩基) に poly(A) ポリメ
ラーゼと ³H ATP を用いて種々の長さの poly
(A) を付加した後、抗体と反応させ沈降する
トリチウムを測定して決めた。

その結果下記表 2 に示すように最低 20 ~
30 塩基の poly(A) があれば 1.6 塩基の RNA
も定量的に沈降することが確かめられた。

表 2 poly(A) 鎖を付加した RNA の反応

RNA	poly(A) 付加量 (塩基)	抗体との結合率 (%)
5SRNA (Yeast)	0	4.1
	6.4	51.6
	26.6	88.6
	66.0	90.8
	98.4	89.2

TMV-RNA	0	25.0
	19.1	77.9
	27.6	92.1
	49.6	93.0
	138.1	95.7

6) A1抗体がDNA、rRNA、5S RNA及びtRNA等細胞に通常存在する核酸と反応しないこと及びpoly(A)⁺mRNAと反応すること(表1)から、細胞の全RNAからpoly(A)⁺mRNAのみ分離することが可能である。それを確かめるためにフェニルヒドラジン投与マウス脾細胞から抽出した全RNAからpoly(A)⁺mRNA(グロビンmRNAが最も多い)の分離を行った。すなわち、脾細胞由来全RNA 200μgにA1抗体100μgを加え沈殿からフェノール法でRNAを回収し(約8μg)、そのRNAの中のグロビンmRNA量を定量した。グロビンmRNA量はグロビンDNAを含むプラスミドpMβG5をニフクトランスレーションで³²Pラベルし、抗体で沈殿したRNAをナイロンメンブラン上に固

と思われる。

(発明の効果)

本発明によれば、全RNAの量は少量で済み、モノクローン抗体はマウス腹水として量産できる。

4 図面の簡単な説明

第1図はDEAEセルロースカラムによる抗体の精製表、第2図はドットハイブリダイゼーション図表。

定してハイブリダイズするドットプロット法で行った。その結果第2図に示したように抗体で沈殿したRNA中にグロビンmRNAが最も多く回収され、本方法によりpoly(A)⁺mRNAが分離できることが確かめられた。

7) 6)と同様にして抗体で沈降するpoly(A)⁺mRNAを回収し、そのRNAの小麦胚芽無細胞蛋白質合成系における蛋白質翻訳活性を調べたところ下記表3の結果のごとく高い翻訳活性があつた。

表3 抗体で沈殿したRNAのin vitro 蛋白合成能

RNA	ug	蛋白合成量	
		%	Ratio
	0	0.17	1
マウス脾細胞全RNA	1	0.35	2.1
抗体で沈殿したRNA	1	0.60	3.5
抗体で沈殿しなかつたRNA	1	0.13	0.76

すなわち、分離したpoly(A)⁺mRNAは分子生物学の研究に十分使用しうる純度を有している

特許出願人

北川良親

栄研化学株式会社

代理人

弁理士 藤盛道夫

